Aus der Wissenschaftlichen Einrichtung (WE 6) Pathologie
im Klinikum Westend der Freien Universität Berlin
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. F. Niedobitek

Inaktivierung und Abbau von Gastrin durch partikelfreie Überstände aus Rattennierenhomogenaten

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Schwenen, Joachim
aus Lingen/Ems

1974

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546512_0039

Aus der Wissenschaftlichen Einrichtung (WE 6) Pathologie
im Klinikum Westend der Freien Universität Berlin
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. F. Niedobitek

Inaktivierung und Abbau von Gastrin durch partikelfreie Überstände aus Rattennierenhomogenaten

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Schwenen, Joachim

aus Lingen/Ems

Referent: Priv.-Doz. Dr. H.P. Seelig

Korreferent: Prof. Dr. W. Oelkers

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 19. 6. 1974

Inhaltsverzeichnis

		Seite
A.	Einleitung und Problemstellung	2
B.	Material und Methodik	9
	1. Reindarstellung von Gastrin I und Gastrin II	9
	a) Aufbau der Extraktionsanlage	9
	b) Der Extraktionsvorgang und die Reindarstellung von Gastrin I und II	12
	2. Untersuchung der pH-, Zeit- und Substratabhängigkeit der Amidhydrolyse von Gastrin II durch partikelfreie Überstände aus Rattennierenhomogenat	16
	a) Herstellung der partikelfreien Überstände aus Rattennierenhomogenat	16
	b) Quantitative Bestimmung des durch Amidhydrolyse freigesetzten Ammoniaks	17
	c) Amidhydrolyse durch 6 Stunden dialysierten partikelfreien Überstand aus Rattennierenhomogenat	21
	d) Chromatographische Untersuchung der Hydrolyse von Gastrin II durch partikelfreie Überstände aus Rattennierenhomogenat	22
	e) Untersuchung der Gastrinfraktionen und der Hydrolyserate mit der Hochspannungselektrophorese	23
C.	Ergebnisse	23
	1. pH-Abhängigkeit der Amidhydrolyse von Gastrin II und CBO-Gly-Phe-NH_2	23
	2. Zeitabhängigkeit der Amidhydrolyse von Gastrin II	24
	3. Substratabhängigkeit der Amidhydrolyse von Gastrin II	24
	4. Chromatographie der Homogenat-Gastrin-II-Inkubate	29
D.	Diskussion	34
E.	Zusammenfassung	39
F.	Literaturverzeichnis	41

A. Einleitung und Problemstellung

J.S. EDKINS injizierte im Jahre 19o5 Katzen intravenös wässrige Extrakte aus dem Magenantrum und löste dadurch eine vermehrte Salzsäuresekretion aus. Den säurestimulierenden Faktor seiner Extrakte nannte er GASTRIN.
Im Jahre 1961 gelang GREGORY und TRACY die Reindarstellung dieses säurestimulierenden Gastrins aus wässrigen Extrakten der Magenantra von Schweinen. Wenig später konnte die Struktur des Schweinegastrins ermittelt und die Isolierung und Analyse menschlichen Gastrins, sowie seine Synthese durchgeführt werden (GREGORY u. TRACY, 1964; GREGORY, HARDY, JONES, KENNER u. SHEPPARD, 1964).

Aus der menschlichen Antrumschleimhaut lassen sich zwei säurestimulierende Heptadekapeptide, Gastrin I und Gastrin II, gewinnen. Das Molekulargewicht liegt für menschliches Gastrin I bei 2o96, für Gastrin II bei 2176. Außer durch eine Sulfatestergruppe am Tyrosinrest von Gastrin II unterscheiden sie sich weder chemisch noch in ihrer physiologischen Wirkung. Das C-terminale Tetrapeptid ist für die biologische Wirkung des Gastrins essentiell (TRACY u. GREGORY, 1964; Abb. 1).
Bei zahlreichen Säugetieren konnte Gastrin gefunden werden. Seine Artspezifität beim Menschen liegt im Vergleich zu der anderer Säugetiere in dem Unterschied einer oder zweier Aminosäuren (Tab. I). Das C-terminale Phenylalanin liegt als Säureamid vor. Die N-terminale Glutaminsäure besitzt aufgrund der Ringbildung durch eine innere Pep-

Tab.I: Struktur von Gastrin und verwandten Peptiden (nach SEELIG, 1971)

Gastrin	Molekulargewicht I	II	
Mensch	2o96	2176	Glu-Gly-Pro-Trp-Leu-Glu-Glu-Glu-Glu-Glu-Ala-Tyr(SO_3)-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH_2
Schwein	2114	2194	Met
Cholecystokinin	3884		-Asp-Tyr(SO_3)-Met-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH_2
Caerulein	1321		Glu-Gln-Asp-Tyr(SO_3H)-Thr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH_2

tidbindung keine freie Aminogruppe. Das Peptid ist dadurch vor dem Angriff von Exopeptidasen - beim Phenylalaninrest vor Carboxypeptidasen, beim Glutamin vor Aminopeptidasen - geschützt (GREGORY, HARDY, JONES, KENNER und SHEPPARD, 1964).
Die Hauptbildungsstätte des Gastrins ist nach immunhistologischer Darstellung und radioimmunologischen Messungen neben der Antrummucosa die Schleimhaut des Duodenums (STREMPLE, ABRAMOFF, VAN OSS, WILSON u. ELLISON, 1967; Mc GUIGAN, 1968). (Tab.II)

Tabelle II

Gastrinaktivität im Gastrointestinaltrakt
(nach SEELIG, 1971)

	Spezies	Gewebe-extr. Tierexp.	Immunhisto-logisch	Gewebe-extr. Radioimmuno-logisch
Antrum	Mensch, Hund, Katze, Schwein	+	+	+
Duodenum	Mensch, Hund, Katze, Schwein	+		+
	Mensch, Schwein	Ø		
Pankreas	Mensch, Hund, Katze, Schwein, Affe	Ø	+	

Die Hauptmasse der gastrinbildenden Zellen wurde jedoch im Antrum gefunden (EDKINS, 1905; KOMAROV, 1938, 1942; UVNÄS, ANDERSON, ELWIN und MALM, 1956; LAI, 1964). Die Zellen selbst liegen in den unteren zwei Dritteln der Antrummucosa zwischen den schleimbildenden Zellen (Mc GUIGAN und GREIDNER, 1971).

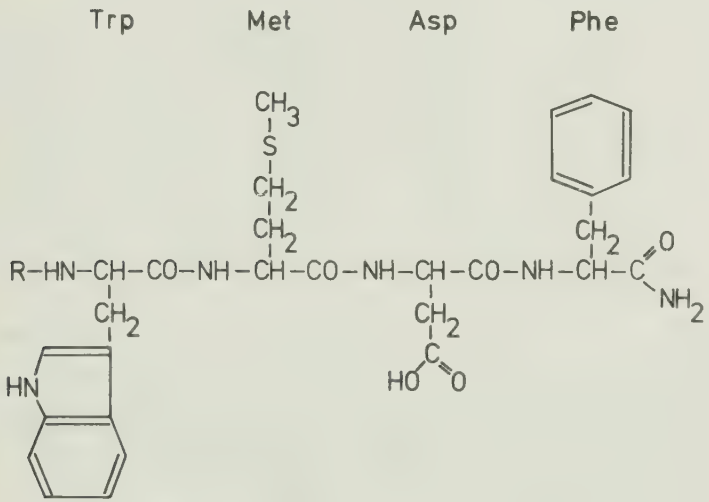


Abb. 1 Tetragastrin - C-terminaler Gastrinrest (14-17)

Die wichtigste Funktion des Hormons ist die Stimulierung der HCl-Sekretion im Magen. Mit 0,5 µg Gastrin/kg Körpergewicht subkutan injiziert, läßt sich die gleiche "maximale" Salzsäuresekretion erreichen, wie mit 40 µg/kg Körpergewicht Histaminphosphat. Mit 2 µg/kg Körpergewicht wird

die Säuresekretion maximal stimuliert (MAKHLOUF, Mc MANUS und CARD, 1964).

Tab. III Serumgastrinspiegel beim Menschen (radioimmunologisch bestimmt)

Spezies	n	Gastrin pg / ml	Autor
Mensch	14	48 ± 42	Mc GUIGAN u. Mitarb. (197o)
	1o2	165 ± 28	TRUDEAU u. Mitarb. (197o)
	7	93 ± 7	REEDER u. Mitarb. (197o a)
	5	63 ± 3	REEDER u. Mitarb. (197o b)
	8	7o ± 17	ISENBERG u. Mitarb. (1971)
	26	44 ± 7	HANSKY u. Mitarb. (1971)
	8	6o ± 9	HANSKY u. Mitarb. (1971)
	93	32 ± 4	KORMAN u. Mitarb. (1971)
	33	82	FRITSCH u. Mitarb. (1972)
	8	54 ± 8	STERN u. WALSH (1973)

Neben der physiologischen Stimulation der Säuresekretion besitzt Gastrin auch eine patho-physiologische Bedeutung. Es ist wesentlich beteiligt bei der durch eine Überproduktion von HCl ausgelösten Ulcusgenese. Ein bekanntes Beispiel stellt das ZOLLINGER-ELLISON-Syndrom dar, bei dem durch autonome Gastrinproduktion in Tumoren der Gastrin bildenden Zellen hohe Konzentrationen des Gastrinheptadekapeptids im Blut nachgewiesen werden (bis 333ooo pg/ml, FRIESEN, BOLINGER, PEARSE und Mc GUIGAN, 197o). In diesen Fällen kommt es zu einer vermehrten Ausscheidung von Gastrin im Urin, die bei einer physiologischen Gastrinproduktion 2% des Serumgastrins beträgt. Die im Urin ausgeschiedene Gastrinmenge bewirkte eine Steigerung der HCl-Sekretion

bei Ratten, denen der Urin der betreffenden Patienten intravenös oder subkutan injiziert wurde (BONFILS, VATIER und ACCARY, 197o; MOORE, MURAT, ENDAHL, BAKER und ZOLLINGER, 1967; WILKEN, HARDY, TURNER, LOWE, HUNT und BILLUPS, 1969; WILSON, MATHISON, SCHULTE und ELLISON, 1968; HALTER, KOHLER und SMITH, 1971).
Es gelang, aus dem Urin von ZOLLINGER-ELLISON-Patienten zwei säurestimulierende Substanzen zu isolieren und weitgehend zu analysieren (BONFILS, VATIER und ACCARY, 197o). Die von den Untersuchern als V-Fraktion bezeichnete Substanz zeigte eine stark sekretionsauslösende Wirkung, wich jedoch in ihrer Aminosäurenzusammensetzung wesentlich von der des Gastrins ab. Die als G-Fraktion bezeichnete Substanz besaß die im Gastrin vorkommenden Aminosäuren, war aber bedeutend weniger aktiv als die V-Fraktion (Tab.IV).

Tab. IV: Aminosäurenzusammensetzung der V-Fraktion aus dem Urin von Patienten mit ZOLLINGER-ELLISON-Syndrom (BONFILS, VATIER u. ACCARY, 197o)

	V-Fraktion	Humangastrin
Asp - NH_2	2	1
Thr	1	-
Ser	5	-
Glu - NH_2	5	6
Pro	-	1
Gly	4 od. 5	2
Ala	2	1
Val	1	-
Met	-	-
Leu	1	1
Tyr	-	1
Phe	-	1
Lys	1	-
His	1	-
Trp	1	2

Auf der Suche nach den Abbaustätten des Gastrins fanden JAFFE und NEWTON (1969) eine deutliche Anhäufung ^{125}J markierten Gastrins in der Niere. Diese Anhäufung stand in deutlichem Gegensatz zur physiologischen Ausscheidung. Bis zwei Stunden nach der Applikation fanden sich nur Spuren der injizierten Substanz im Urin (NEWTON und JAFFE, 1971). Nach Inkubation von Tetragastrin (LASTER und WALSH, 1969) und Pentagastrin (GLASSS, SCHWARTZ und WALTER, 1969) mit Homogenaten aus Nierenrinde konnte eine enzymatische Inaktivierung beider Substanzen nachgewiesen werden. Daneben beschrieben GLASS, SCHWARTZ und WALTER (1969) eine Hydrolyse des C-terminalen Phenylalaninamids von Pentagastrin durch eine "Carboxamidopeptidase" in der Nierenrinde. Einen Hinweis auf den enzymatischen Abbau von Gastrin gaben die Ergebnisse einer Inaktivierung von Gastrin II durch partikelfreie Überstände aus Nierenhomogenat der Ratte (SEELIG, 1971). Gastrin und Pentagastrin wurden bei der Inkubation mit partikelfreien Überständen aus Rattennierenhomogenat in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer und vom Proteingehalt vollständig inaktiviert.

Anhand der folgenden Versuche soll der enzymatische Gastrinabbau durch Homogenate der Niere untersucht werden.

B. Material und Methodik

1. Reindarstellung von Gastrin I und II

Bei der Extraktion und Reindarstellung von Gastrin I und II wurde im Prinzip nach der von GREGORY und TRACY (1964) erarbeiteten Methode vorgegangen.

a) Aufbau der Extraktionsanlage

Die Apparatur bestand aus Heizkessel, Filterkasten, Durchlaufbox und Elutionsgerät. Der doppelwandige Heizkessel aus Aluminium (Abb. 2 a), mit einem einwandigen Auslauftrichter, hatte ein Fassungsvermögen von 15o Litern. Die Deckplatte diente gleichzeitig als Halterung für ein Rührwerk, für 5 U-förmig gebogene Heizstäbe und für eine ringförmige Wassereinlaufleitung. Als Filter wurden zum Abfangen der groben Bestandteile der Extraktionsflüssigkeit ein Nylonnetz, vier Mullagen, drei Nylontuchlagen und eine Glasfaserdoppelschicht verwandt (Abb. 2 b).
Der Filterkasten war durch eine Öffnung in seiner Deckplatte mit dem Heizkessel verbunden. Die Durchlaufbox besaß eine abhebbare Deckplatte.

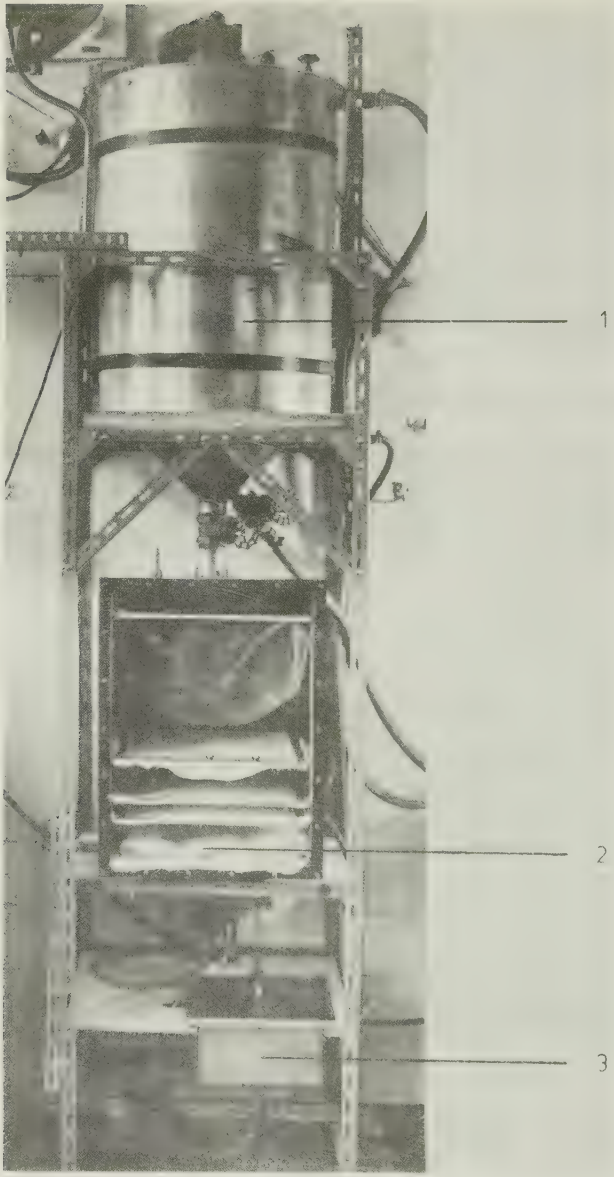


Abb. 2a Extraktionsanlage - Gesamtansicht

1) Heizkessel
2) Filterkasten
3) Durchlaufbox

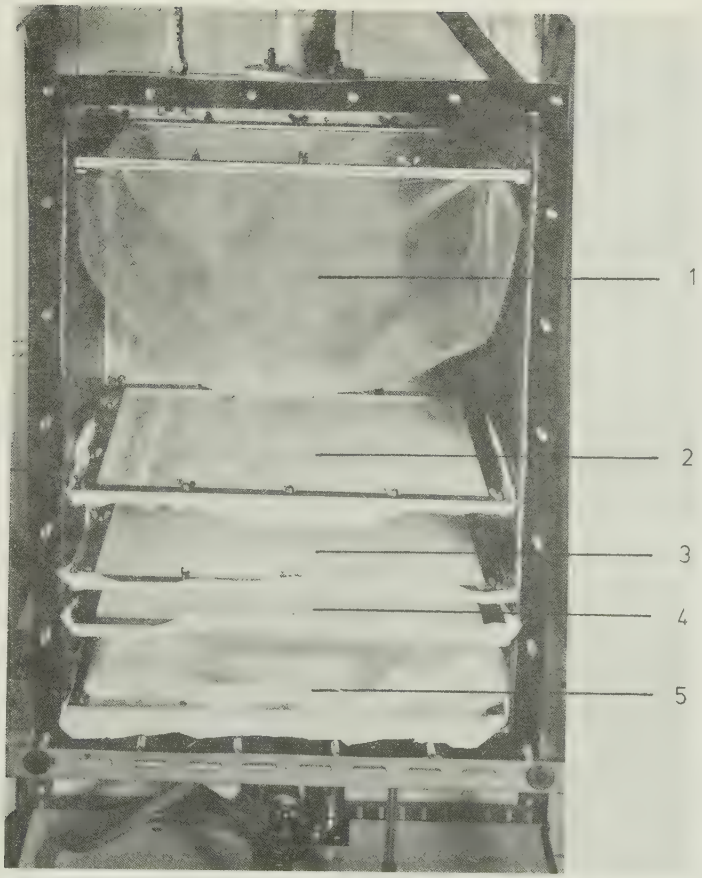


Abb. 2b: Der Filterkasten der Extraktionsanlage

1) Nylonnetz
2) vierfacher Mullfilter
3) u. 4) Nylontuchlagen
5) Nylontuchlage mit Glasfaserdoppelschicht

b) Der Extraktionsvorgang und die Reindarstellung von Gastrin I und II

Je 12o Schweineantra wurden auf dem Schlachthof sofort nach Tötung der Tiere gesammelt. Nach Spülen in kaltem Wasser und Zerkleinern im Fleischwolf wurden sie in 15o l kochendes Wasser gegeben und 2o Minuten unter ständigem Rühren im Heizkessel der Extraktionsapparatur gekocht. Der Extrakt wurde anschließend auf 2o° C abgekühlt und mit o,5 n NaOH auf pH 8,o eingestellt. 15o g (Trockengewicht) säure- und alkalibehandelte DEAE-Zellulose (WHATMAN DE II) wurde während des Kühlvorganges in die Durchlaufbox gegeben. Der Durchlauf des Antrumextraktes wurde auf eine Geschwindigkeit von 5o l/h eingestellt. Die Zellulose wurde anschließend in 5 l kaltem Wasser klargespült und mit 24oo ml o,2 N NaOH eluiert. Das Eluat wurde über einen Büchnertrichter abgesaugt; nach Zugabe von o,o2% Natriumacid wurde zur Fällung der Proteine der pH mit konzentrierter HCl auf 4,o eingestellt. Die Sedimentation der Proteine erfolgte über Nacht bei 4° C. Die sedimentierten Proteine wurden 1o Minuten bei 2° C und 2ooo g abzentrifugiert, das Sediment gesammelt und bei - 18° C bis zur Weiterverarbeitung gelagert.

Das saure Sediment aus 4oo-6oo Antra wurde mit Aqua dest. auf ein Volumen von 6oo ml aufgefüllt, mit 18 N Ammoniak auf pH 1o eingestellt und im Eisbad mit 3oo g Dikalium-

hydrogenphosphat und 48o ml Isopropanol versetzt. Nach 4o Minuten Rühren und anschließendem Zentrifugieren bei 2ooo g wurde die Isopropanolphase abgesaugt und gesammelt. Die wässrige Phase wurde erneut mit der oberen Phase eines Gemisches aus 2oo ml Aqua dest., 4 ml 18 N Ammoniak, 1oo g Dikaliumhydrogenphosphat und 148 ml Isopropanol zusammengegeben, 2o Minuten gerührt und 1o Minuten zentrifugiert. Beide Isopropanolphasen wurden dann mit dem dreifachen Volumen Diäthyläther und 1oo ml Aqua dest. extrahiert. Nach dem Zentrifugieren wurde der überstehende Äther abgesaugt und das Isopropanol-Äthergemisch noch einmal nach Zugabe von 5o ml Aqua dest. extrahiert. Die Verdunstung des restlichen Äthers erfolgte während 12 Stunden bei geringem Unterdruck, offenem Luftstrom und 2^{o} C. Die Proteine der wässrigen Phase wurden darauf mit Eisessig bei pH 4 gefällt, zentrifugiert und gesammelt. Das sedimentierte Protein wurde in 3o ml Aqua dest. unter Zugabe von einigen Tropfen Ammoniak gelöst, mit Eisessig gefällt und nach erneuter Zentrifugation in 5 ml Aqua dest. unter Zugabe einiger Tropfen Ammoniak wieder gelöst. Die daran anschließende chromatographische Auftrennung des Materials erfolgte auf Sephadex G 5o (2,5 x 1oo cm). Als Elutionsmittel wurde o,o4 M Ammoniumbikarbonat verwendet. Die Durchflußgeschwindigkeit lag bei 1o ml/h. Fraktionen zu je 5 ml wurden gesammelt und im ZEISS-Spektralphotometer PMQ II in o,5 cm Quarzküvetten bei 28o nm

auf ihren Proteingehalt untersucht. Zur weitgehenden Entfernung des Ammoniaks wurde das Lyophilisat zweimal rückgelöst und lyophilisiert. Die Gastrinfraktion fand sich regelmäßig im letzten Peak des Chromatogramms. 2o mg des Lyophilisats (Ausbeute 5o-7o mg Rohgastrin/ 6oo Antra) wurden in o,o2 M Ammoniumbikarbonat gelöst und auf eine mit dem Lösungsmittel äquilibrierte AE-Zellulosesäule (o,9 x 3o cm, WHATMAN) gegeben. Eluiert wurde mit einem Ammoniumbikarbonatgradienten der Form $C = C_2 - D \times e^k$ (C = Konzentration des Elutionsmittels; C_2 = Differenz der anfänglichen Konzentration des Gradientenelutionsmittels: o,18 M; D = Konzentration des Gradientenelutionsmittels: o,2 M; k = Quotient aus Volumen der verbrauchten Eluatmenge und Volumen des niedermolekularen Elutionsmittels im Mischgefäß: 18o ml). Bei einer Durchflußgeschwindigkeit von 5 ml/h wurden Fraktionen zu je 2,5 ml gesammelt. Nach anfänglicher Elution inaktiver Proteine wurden Gastrin I und Gastrin II vollständig getrennt erhalten (Abb. 3).
Die dem Gastrin I und Gastrin II entsprechenden Fraktionen wurden dreimal lyophilisiert. Die weitere Reinigung von Gastrin I und II erfolgte nochmals durch Gradienten-Chromatographie auf AE-Zellulose mit Ammoniumbikarbonat. Das Ammoniumbikarbonat hatte zu Beginn der Elution eine Molarität von o,o5 M für Gastrin I und von o,o6 M für Gastrin II. Bei Gastrin I wurden zur Herstellung des Gradienten o,2 M, bei Gastrin II o,3 M Ammoniumbikarbonat

verwendet. Bei einer Durchflußgeschwindigkeit von 1o ml/h wurden Fraktionen zu je 5 ml gesammelt. Die zentralen Teile der scharf abgegrenzten Fraktionen von Gastrin I und II wurden zur weitgehenden Entfernung des Ammoniumbikarbonats mehrfach lyophilisiert.

Abb. 3: Chromatographische Trennung in Gastrin I und Gastrin II
AE-Zellulose (o,9 x 3o cm)
Startpuffer o,o2 M NH_4 HCO_3
Gradient: o,2 -(o,18 x e) $\frac{Vol_E}{18o}$

Die Gastrine wurden weiter über die Hochspannungselektrophorese gereinigt. Dabei wurden 2 mg des lyophilisierten Materials in Aqua tridest. gelöst und auf SCHLEICHER-SCHÜLL - Papier (MN 261) strichförmig aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte in Pyridin-Eisessig-Wasser (1oo:4:9oo) pH 6,3 bei einem Spannungsgradienten von 62,5 V/cm. Die Laufzeit betrug 1,5 Stunden. Nach dem Trocknen des Papiers wurden aus der Mitte und den Rändern ausgeschnittene Streifen nach der Methode von RYDON und SMITH (1952) mit Chloriminoreagenz gefärbt und die dem Gastrin entsprechenden Abschnitte mit o,o4 M Ammoniumbikarbonat eluiert und lyophilisiert. Nach Lösen des Lyophilisats in Aqua tridest. wurde mit 15% Essigsäure pH 2,o bei gleicher Spannung und bei gleicher Laufzeit ein zweites Mal aufgetrennt. Anschließend wurde das Gastrin mit o,o4 M Ammoniumbikarbonat eluiert und mehrfach lyophilisiert. (Die biologische Aktivität wurde von SEELIG untersucht).

2. Untersuchung der pH-, Zeit- u. Substratabhängigkeit der Amidhydrolyse von Gastrin II durch partikelfreie Überstände aus Rattennierenhomogenat

a) Herstellung der partikelfreien Überstände aus Rattennierenhomogenat

15 Ratten wurden in Äthernarkose die Nieren entnommen und in steriler o,9% Kochsalzlösung, durch Eisbad gekühlt, gewaschen. Die Nieren wurden sauberpräpariert, nochmals in o,9% Kochsalzlösung gewaschen und auf Fließpapier getrocknet. Nach Zerkleinerung mit dem Skalpell wurden sie durch eine Embryonen-

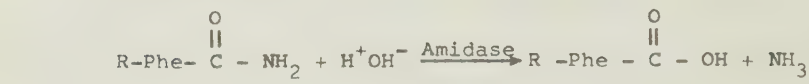
quetsche gepreßt. Anschließend wurden sie gewogen und mit dem doppelten Anteil o,9% Kochsalzlösung versetzt (Gewicht/Volumen). Im Messerhomogenisator (SORVALL-OMNIMIXER) wurde das Material 1o Minuten bei maximaler Drehzahl homogenisiert. Mit Abstand von einer Minute - zur Vermeidung von Temperaturanstieg - wurde jeweils 1o Mal eine Minute homogenisiert.

Zur Abtrennung von Kernen und Zelltrümmern wurde das Homogenat in der Kühlzentrifuge bei 1ooo g 3o Minuten und der erhaltene Überstand in der Ultrazentrifuge bei 1o4 ooo g 6o Minuten zentrifugiert. Der so gewonnene partikelfreie Überstand dialysierte dann 6 Stunden (VISKING 8/32 Dialysierschläuche, 7 mm Ø, o,o5 mm Wandstärke) gegen sterile o,9% Kochsalzlösung. Die Kochsalzlösung wurde durch einen Magnetrührer in Bewegung gehalten. Anschließend wurde der Überstand in Ampullen abgefüllt, bei - 6o° C eingefroren und nach Verschmelzen der Ampullen bei - 9o° C gelagert. Der Proteingehalt des partikelfreien Überstandes wurde nach KJELDAHL bestimmt und betrug o,83 mg/1oo µl.

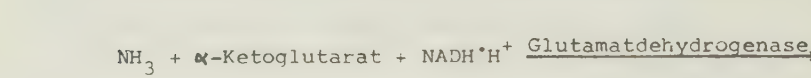
b) Quantitative Bestimmung des durch Amidhydrolyse freigesetzten Ammoniaks (Tab. V)

Die enzymatische Hydrolyse der C-terminalen Amidgruppe von Gastrin und CBO-Gly-Phe-NH_2 und die sich daran anschließende Bestimmung des freigesetzten Ammoniaks erfolgt in zwei Reaktionsschritten:

a) enzymatische Hydrolyse der C-terminalen Endgruppe des Substrates:



b) enzymatische Bestimmung des freigesetzten Ammoniaks:



Das hier angewandte Verfahren entspricht der von SCHMIDT und SCHWARTZ (1966) entwickelten Methode der quantitativen Ammoniakbestimmung.

Tab. V: Reaktionsansatz zum Nachweis der Ammoniakfreisetzung

µl	Leerwert	Standard	Probe	Kontrolle 1	Kontrolle 2
NH_4Cl	-	1oo	-	-	-
Puffer	2oo	1oo	-	1oo	1oo
Substrat	-	-	1oo	-	1oo
Enzym	-	-	1oo	1oo	-
Inkubation 37°C					
Trichloressigsäure	2oo	2oo	2oo	2oo	2oo
Zentrifugieren, Eisbad					
Überstand		1oo		1oo	
K_3PO_4		1oo		1oo	
Testgemisch		15o		15o	
15o µl entnehmen und E_1 messen					
GLDH dem Rest zugeben		6 nach 45 Minuten E_2 messen		6	

Reagenzien:

1. o,2 M Trispuffer pH 7,8. 4,84 g Trishydroximethylaminomethan in 5o ml Aqua dest. lösen, 32,5 ml o,8 M HCl zugeben und auf 2oo ml Aqua dest. auffüllen. Dunkle Flasche.

2. o,o8 M α-Ketoglutarat. 116,6 mg α-Ketoglutarat in 5 ml Aqua dest. lösen, mit 1 N NaOH unter pH-Meterkontrolle auf pH 7,o einstellen und mit Aqua dest. auf 1o ml auffüllen.

3. $NADH^{\bullet}H^{+}$-Lösung. 2o mg $NADH^{\bullet}H^{+}$ mit 1% $NaHCO_3$ in einem Volumen von 1,o ml lösen.

4. Glutamatdehydrogenase (GLDH) 2o mg/2 ml in Glycerin frei von Ammoniumionen.

5. o,2 M $K_3\ PO_4{}^{\bullet}3\ H_2O$. 5,32 g Trikaliumphosphat in 1oo ml Aqua dest. lösen.

6. Testgemisch: 46 ml Trispuffer, 3 ml α-Ketoglutarat und 1 ml $NADH^{\bullet}H^{+}$ zusammengeben. Diese Lösung ist nur einige Tage bei 4° C haltbar. Sie wurde vor Versuchsbeginn jeweils frisch angesetzt.

7. 1o% Trichloressigsäure.

8. Standardlösung: 55,5 mg NH_4 Cl in Aqua dest. lösen, 2,5 ml 1 N HCl zugeben und mit Aqua dest. aut 25o ml auffüllen. Die NH_3-Konzentration beträgt 4oo n Mol/1oo µl. Als Standard wurde eine 1:1o verdünnte Lösung verwendet.

Ausführung:

Alle Glasgeräte wurden in RBS gereinigt, mit verdünnter HCl nachgespült und mit NH_3-freiem Wasser gründlich gewaschen. Die Geräte wurden in Exsiccatoren über konzentrierter Schwefelsäure gelagert. Die Lösungen wurden nur mit frischem, bidestilliertem Wasser aus einer Quarzglasapparatur, die mit Aqua dest. gespeist wurde, hergestellt. Die Reaktionen wurden in verschließbaren Reaktionsgefäßen (Mikrolitersystem-Eppendorf) durchgeführt. Die Dosierung der Volumina fand ausschließlich mit geeichten Konstriktionspipetten statt. Die freigesetzte NH_3-Menge wurde durch den Vergleich mit einer wie Leerwert und Probe behandelten Standard-Lösung (4o n Mol NH_4/1oo µl) nach folgender Formel berechnet:

$$o{,}o4 \cdot \frac{(E_P - E_L) - (E_{K_1} - E_L) - (E_{K_2} - E_L)}{(E_{St} - E_L)} \text{ µmol } NH_3/1oo \text{ µl}$$

(P=Probe; L=Leerwert; St=Standard; K_1=Enzym; K_2=Substrat)

Für die Berechnung der Werte mit einem Tischcomputer (WANG) wurde die Gleichung in:

$$o{,}o4 \cdot \underbrace{\frac{E_P - E_{K_1}}{E_{St} - E_L} - o{,}o4}_{A} \quad \underbrace{\frac{E_{K_2} - E_L}{E_{St} - E_L}}_{B} = \text{µmol } NH_3/1oo \text{ µl}$$

umgeändert und entsprechend programmiert. Bei der Mitbestimmung nur einer Kontrolle (K_1) wird der Teil B gleich O.

c) Amidhydrolyse durch 6 Std. dialysierten partikelfreien Überstand aus Rattennierenhomogenat

Die Freisetzung von Ammoniak aus dem Substrat Gastrin II wurde in Abhängigkeit vom pH der Inkubationslösung, von der Zeitdauer der Inkubation und von der Konzentration des Substrates untersucht. Von CBO-Gly-Phe-HN_2, einem in der C-terminalen Struktur analogen Dipeptidamid, wurde die pH-Abhängigkeit der Desamidierung ebenfalls geprüft.

1. Zur Bestimmung des pH-Optimums wurden 2,5 mg Homogenatprotein im Verhältnis 1:2 mit o,132 Phosphat oder o,4 M Trispuffer (Puffermolarität o,o66 M, bzw. o,2 M) verdünnt. Von diesem verdünnten Überstand wurden 1oo µl mit 1oo nMol Gastrin II (bzw. 1oo nMol CBO-Gly-Phe-NH_2) in 1oo µl o,9% Kochsalzlösung bei 37° C 6o Minuten bei pH 6,o; 6,4; 6,8; 7,2; 7,8 und 8,o (CBO-Gly-Phe-NH_2 3o Minuten bei pH 7,o; 7,4; 7,8; 8,2; 8,6 und 9,o) inkubiert (Endmolarität der gepufferten Lösung o,o33 M, bzw. o,1 M).

2. Der Reaktionsansatz zur Untersuchung der Zeitabhängigkeit der Amidhydrolyse von Gastrin II bestand aus 2,5 mg Homogenatprotein, im Verhältnis 1:2 mit o,132 M Phosphatpuffer pH 6,4 verdünnt. Davon wurden 1oo µl mit 1oo µl o,9% Kochsalzlösung bei 37° inkubiert. Die Inkubationszeiten betrugen 5 Min., 1o Min., 2o Min., 3o Min. und 6o Minuten.

3. 2,5 mg Homogenatprotein wurden zur Untersuchung der Substratabhängigkeit der Amidhydrolyse im Verhältnis 1:3 mit o,132 M Phosphatpuffer pH 6,4 verdünnt. 1oo µl

dieser Verdünnung wurden mit 25-2oo n Mol Gastrin (in 1oo µl o,9% Kochsalzlösung 6o Minuten bei 37° C inkubiert.

d) Chromatographische Untersuchungen der Hydrolyse von Gastrin II durch partikelfreie Überstände aus Rattennierenhomogenat

15o ul des partikelfreien Überstandes wurden im Verhältnis 1:2 mit o,132 M Phosphatpuffer pH 6,4 verdünnt und mit 15o n Mol Gastrin II (in 15o µl o,9% Kochsalzlösung) O Std., 1 Std. und 5 Std. inkubiert, anschließend auf eine mit o,o6 M Phosphatpuffer äquilibrierte Säule Sephadex G 25 (o,9x3o cm) aufgetragen und mit o,o6 M Phosphatpuffer pH 6,4 bei einer Durchflußgeschwindigkeit von 7,o ml/h eluiert.
Der Eiweißgehalt des Eluats wurde fortlaufend in MRD-Mikrodurchflußküvetten eines mit Küvettenautomatik ausgerüsteten ZEISS-Spektralphotometers PMQ II bei 28o nm gemessen (Schichtdicke o,5 cm) und mit einem Kompensationsschreiber (Servogor) registriert. Eine Nullpunktkontrolle erfolgte alle 7 Minuten. Vor jedem Versuch wurde die Säule 8 Std. mit Phosphatpuffer eluiert. Nach den einzelnen Versuchen wurde als Kontrolle ein bei 37° C inkubierter Nierenzellüberstand (3oo µl) chromatographisch aufgetrennt. Zur Kontrolle wurde auch ein1 Std. bei 6o° C hitzeinaktivierter und mit 15o n Mol Gastrin II (in 15o µl o,9% Kochsalzlösung) 5 Std. inkubierter Überstand chromatographisch untersucht.

e) Untersuchung der Gastrinfraktionen und der Hydrolyserate mit der Hochspannungselektrophorese

Die auf Sephadex G 25 erhaltenen Fraktionen des Homogenat-Gastrin-Inkubats wurden gesammelt, lyophilisiert, in 2oo µl o,o4 M Ammoniumbikarbonat gelöst, bei 7 ml/h Durchflußgeschwindigkeit auf einer mit dem Lösungsmittel äquilibrierten Säule Sephadex G 1o (o,9x3o cm) entsalzt und nach der oben beschriebenen Methode gemessen, registriert und in sterilen Ampullen aufgefangen. Die Fraktionen des hydrolysierten Gastrins wurden zur Entfernung des Ammoniumbikarbonats 3 mal lyophilisiert. Nach Lösen der einzelnen Fraktionen in Aqua tridest. wurden sie in Mengen von 25 µl punktförmig auf Schleicher-Schüll-Papier MN 261 aufgetragen und mit Pyridin-Eisessig-Wasser (1oo:4:9oo) pH 6,3 bei einem Spannungsgradienten von 62,5 V/cm und einer Laufzeit von 9o Minuten elektrophoretisch aufgetrennt (CAMAG-Hochspannungselektrophorese). Die getrockneten Pherogramme wurden mit Chloriminoreagenz und Ninhydrin-Essigsäure gefärbt.

C. Ergebnisse

Das für die Versuche verwendete Gastrin erwies sich bei der hochspannungselektrophoretischen Untersuchung (Pyridin: Eisessig:Wasser; pH 6,3) als homogen. Gastrin II besaß eine schnellere anodische Mobilität als Gastrin I. Nynhydrinfärbbares Material war auf dem Pherogramm nicht nachweisbar.

1. pH-Abhängigkeit der Amidhydrolyse von Gastrin II und CBO - Gly - Phe - NH_2

Die Ammoniakabspaltrate von Gastrin II wurde bei pH 6,o; 6,4; 6,8; 7,2; 7,8 und 8,o gemessen, die von CBO-Gly-Phe-NH_2 bei pH 7,o; 7,8; 8,2; 8,6 und 9,o. Die höchste Ammoniakabspaltrate im Verlauf der Amidhydrolyse von Gastrin II durch 6 Stunden dialysierten partikelfreien Überstand aus Rattennierenhomogenat lag bei pH 6,4. Mit steigenden pH-Werten sank die Aktivität der Amidase im alkalischen Bereich schnell ab. Es wurden maximal 63,o% des eingesetzten Substrates in der Inkubationszeit von 6o Minuten desamidiert. Das CBO-Gly-Phe-NH_2 zeigte von pH 7,o bis pH 9,o eine nahezu kontinuierlich abnehmende Ammoniakabspaltung (Abb. 4).

2. Zeitabhängigkeit der Amidhydrolyse von Gastrin II

Die Inkubationszeiten betrugen 5 Min., 1o Min., 2o Min., 3o Min. und 6o Min. bei 37^{o} C. Im Verlauf der Inkubationszeiten von O-3o Minuten zeigte sich zwischen der Menge des freigesetzten Ammoniaks und der Dauer der Reaktionszeit eine nahezu lineare Beziehung (Abb. 5). In dieser Zeit wurden 43,8% des eingesetzten Gastrins desamidiert. In der Gesamtzeit wurden 59,o% inaktiviert.

3. Substrat-Abhängigkeit der Amidhydrolyse von Gastrin II

In dieser Versuchsreihe wurde die Ammoniakabspaltung bei verschiedenen Substratmengen im Reaktionsansatz bestimmt.

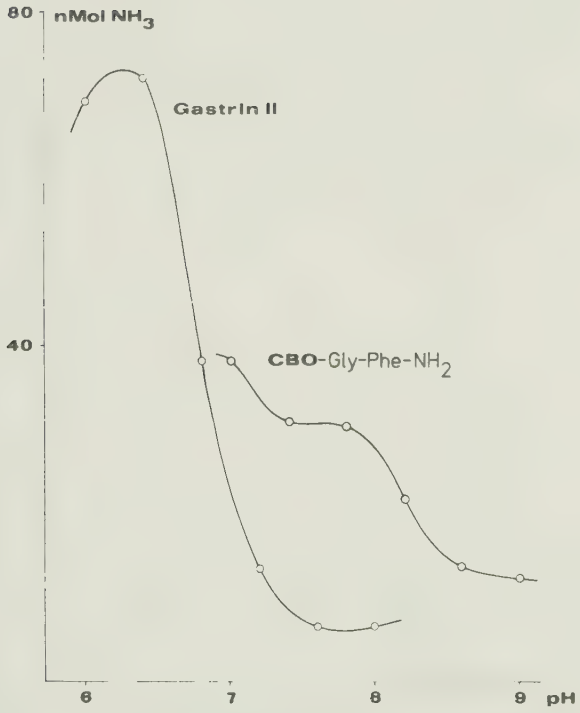


Abb. 4: pH-Optimum der Amidhydrolyse von Gastrin II und CBO - Gly - Phe - NH_2 im 6 Std. dialysierten partikelfreien Überstand aus Rattennierenhomogenat.

Ansatz:
2,5 mg Homogenatprotein + 1oo n Mol Gastrin II, bzw. CBO - Gly - Phe - NH_2, in 2oo µl Phosphatpuffer, bzw. Trispuffer.

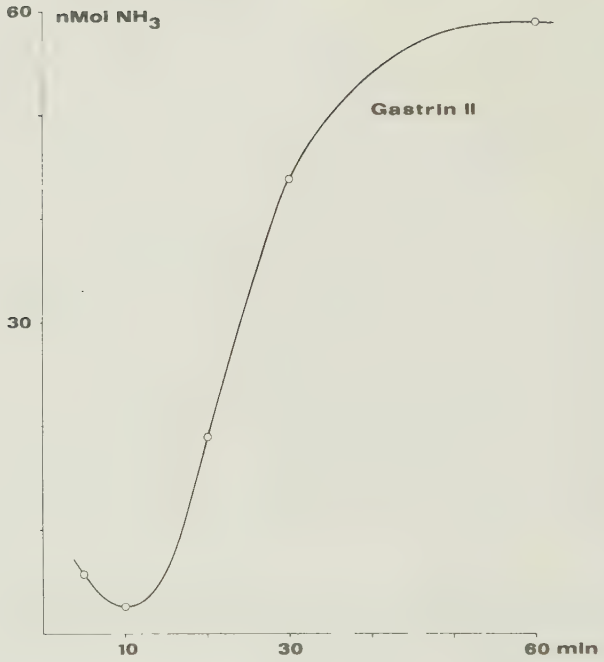
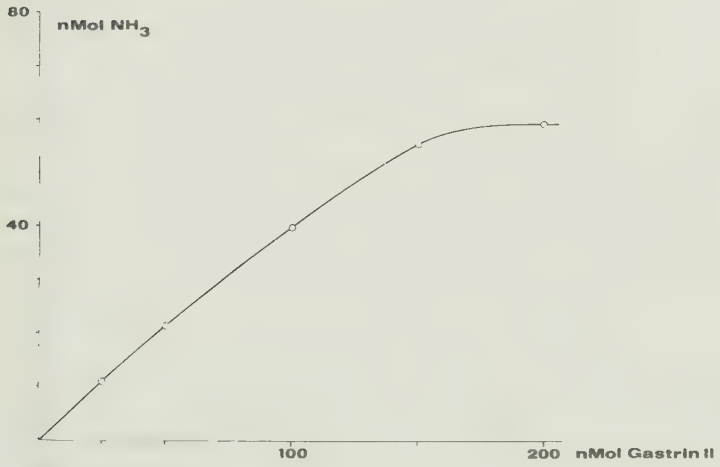


Abb. 5: Zeitabhängigkeit der Amidhydrolyse von Gastrin II in partikelfreien Überständen aus Rattennieren-homogenat.

Ansatz:
2,5 mg Homogenatprotein + 1oo n Mol Substrat in 2oo µl Phosphatpuffer pH 6,4.

Messungen wurden mit Substratmengen von 25 n Mol, 4o n Mol, 15o n Mol und 2oo n Mol Gastrin II durchgeführt. Das Verhältnis der Amidhydrolyse der C-terminalen Amidgruppe, gemessen an der Größe der Ammoniakabspaltung, zur Substratkonzentration stellte sich bis zu einer Gastrinkonzentration von 1oo n Mol/3oo µl Reaktionsansatz annähernd als lineare Funktion dar (Abb. 6a).



bb. 6a: Ammoniakabspaltung aus Gastrin II durch partikelfreie Überstände aus Rattennierenhomogenat (Proteingehalt: o,83 mg/1oo µl) bei steigenden Substratkonzentrationen.

Ansatz:
2,5 mg Homogenatprotein + 25-2oo n Mol Gastrin II in 2oo µl Phosphatpuffer pH 6,4.

Eine Substratsättigung war bei 2oo n Mol Gastrin II/3oo µl Reaktionsansatz erreicht. Das entspricht einer Substratkonzentration von 66,5° $1o^{-5}$ Mol/l. Die Michaeliskonstante wurde unter Anwendung des Lineweaver-Burk-Diagramms bestimmt. Sie betrug für unsere Versuchsbedingungen Km = 1,6° $1o^{-3}$ Mol/l (Abb. 6b).

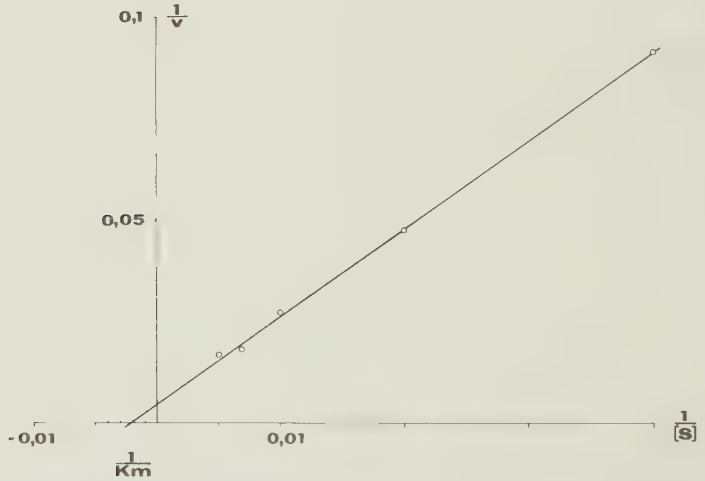


Abb. 6b: Die Affinität des partikelfreien Überstandes aus Rattennierenhomogenat gegenüber Gastrin II - Km = 1,6° $1o^{-3}$ Mol/l.

4. Chromatographie der Homogenat-Gastrin II - Inkubate

Bei der Trennung der Inkubate auf Sephadex zeigte sich gegenüber dem Eichchromatogramm mit hitzeinaktiviertem und mit O Stunden inkubiertem Überstand kein Unterschied. Gastrin II stellte sich als einheitlicher Peak hinter dem Homogenatpeak unverändert dar. Nach 2 Std. Inkubation erschienen neben dem verminderten Gastrinpeak niedermolekulare Bruchstücke. Nach 5 Std. war der Gastrinpeak verschwunden. Auf dem Elutionschromatogramm waren nur noch Substanzen geringerer Molekülgröße sichtbar (Abb. 7a,b,c). Nach der Entsalzung wurden die gesammelten Gastrin-Fraktionen mit Ammoniumbikarbonat auf Sephadex G 1o rechromatographiert. Sie erschienen immer als einheitlicher Peak. Der Gastrinpeak aus dem mit hitzeinaktiviertem Überstand 5 Std. inkubiertem Material zeigte bei der hochspannungselektrophoretischen Untersuchung keinen Unterschied in der Mobilität gegenüber nativem Gastrin (Abb. 8).
Der Gastrinpeak aus dem O Std. Inkubat mit aktivem Nierenzellüberstand wies eine kleine, zur Anode hin wandernde Fraktion auf. Es handelt sich hierbei um eine in der Zeit zwischen Inkubation und vollständiger chromatographischer Auftrennung entstandene geringe Menge desamidierten Gastrins. Das 2 Std. Inkubat zeigte auf dem Pherogramm neben dem desamidierten Gastrin noch eine schneller zur Anode wandernde Fraktion. Bei der Chromatographie auf Sephadex G 25 und G 1o verhielt sie sich ähnlich wie Gastrin II und Desamidogastrin. Die niedermolekularen

Abb. 7a: Zeitabhängige Gesamthydrolyse von Gastrin II durch partikelfreie Überstände aus Rattennieren-homogenat. Stadium I-O Std.-Inkubation.
a) partikelfreier Überstand;
b) Gastrin II;
Ansatz:
Chromatographie auf Sephadex G 25 (o,9x3o cm), 15o µl partikelfreier Nierenzellüberstand + 15o Mol Gastrin II in Phosphatpuffer pH 6,4.

Abb. 7b: Zeitabhängige Gesamthydrolyse von Gastrin II durch partikelfreie Überstände aus Rattennieren-homogenat, Stadium II - 2 Std.-Inkubation.

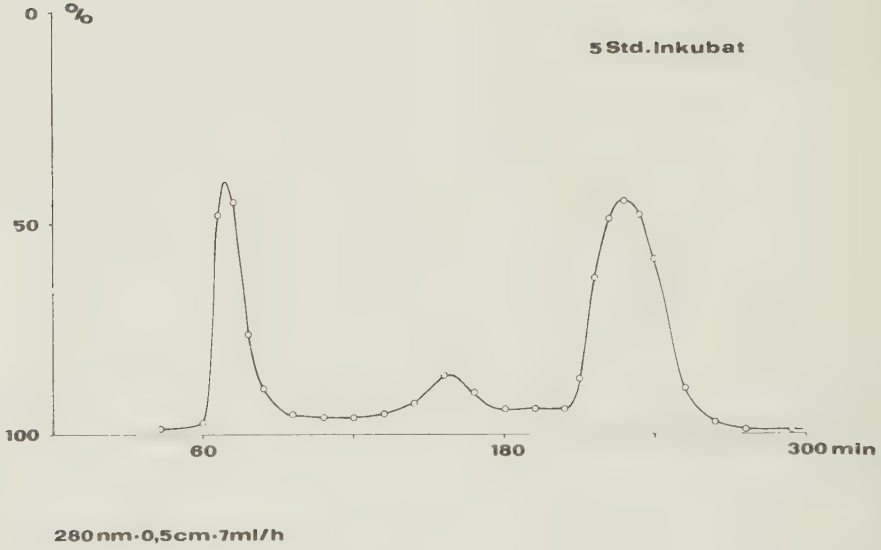


Abb. 7c: Zeitabhängige Gesamthydrolyse von Gastrin II durch partikelfreien Überstand aus Rattennieren-homogenat, Stadium III - 5 Std.-Inkubation.

Bruchstücke des 5 Std. inkubierten Überstandes waren nur noch sehr gering nachweisbar. Bei der Chromatographie dieser niedermolekularen Bruchstücke auf Sephadex G 1o erschienen sie als ein einheitlicher Peptidgipfel.

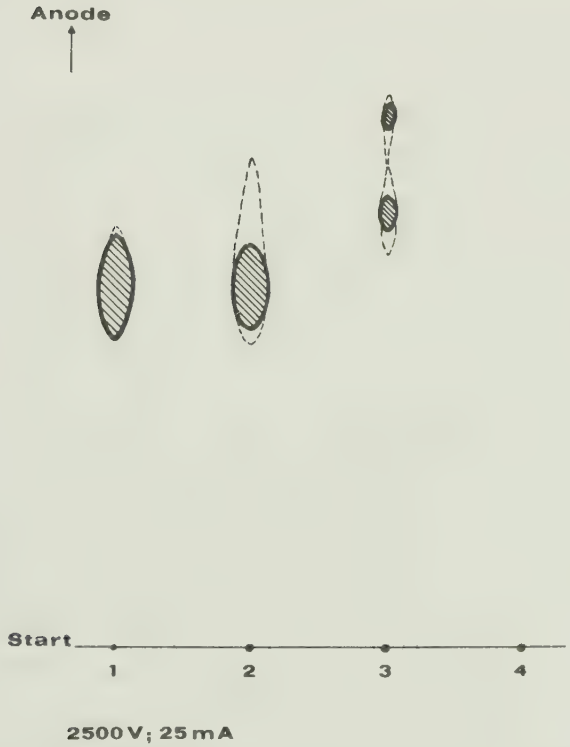


Abb. 8: Hochspannungselektrophoretische Untersuchung der Einzelfraktionen der Gesamthydrolyse von Gastrin II durch partikelfreie Überstände aus Rattennierenhomogenat.
1) - unverändertes Gastrin II, 2) - O Std. inkubiert, 3) - 2 Std. inkubiert, 4) - 5 Std. inkubiert.

D. Diskussion

Die Untersuchungen von JAFFE und NEWTON (1969) lassen die Niere als ein wichtiges Organ im Inaktivierungs- und Abbauprozeß des Gastrins erscheinen. Sie fanden nach Injektion ^{125}J - markierten Gastrins eine gegenüber der Leber deutlich vermehrte Einlagerung radioaktiven Materials im Nierengewebe von Hunden.
Gegen einen ausschließlich in der Niere stattfindenden Gastrin abbau sprechen die Untersuchungen von TRUEBLOOD, KOHATSU und OBERHELMAN (1969). Sie führten Versuche an beidseitig nephrektomierten Shay-Ratten (Pylorusligatur, fakultative hohe oder tiefe Oesophagusligatur, fakultative Vagotomie) durch. Es zeigte sich, daß nach Injektion verschieden hoher Dosen synthetischen Humangastrins keine deutlich erhöhte Säuresekretion gegenüber nicht nephrektomierten Kontrolltieren eintrat. Es müßte aufgrund der Ergebnisse von JAFFE und NEWTON bei nephrektomierten Tieren innerhalb der Beobachtungszeit von 4 Stunden eine deutliche Erhöhung der Säuresekretion eingetreten sein.
Eine Beteiligung enzymatischer Prozesse beim Abbau eines Tetragastrinderivates durch Nieren- und Leberzellüberstände konnten LASTER und WALSH (1968) nachweisen. Beim Pentagastrin wurde ferner eine Hydrolyse des C-terminalen Phenylalaninamids durch eine "Carboxamidopeptidase" aus der Nierenrinde beschrieben (GLASS, SCHWARTZ u. WALTER, 1969). Einen Hinweis auf enzymatische Inaktivierungs- und

Abbauvorgänge von Gastrin in der Niere gaben die Versuche von SEELIG (1971).

Die hier durchgeführten Untersuchungen mit partikelfreien Überständen aus Rattennierenhomogenat bestätigen das Vorhandensein einer gastrinangreifenden Amidase in der Niere. Das pH-Optimum dieser Amidase liegt für Gastrin II bei pH 6,4. Die Abspaltung von Ammoniak nahm bei CBO-Gly-Phe-NH_2 von pH 7,o bis pH 9,o ebenfalls kontinuierlich ab. Der zeitliche Reaktionsablauf verläuft bei einem Enzymangebot von 2,5 mg und einer Substratmenge von 1oo n Mol/ 2oo ul Gastrin II bis 3o Minuten linear. In dieser Zeit wurden 74% des in 6o Minuten hydrolysierten und 43,8% des eingesetzten Substrates umgesetzt. Die Michaeliskonstante der Amidase beträgt: $K_m = 1{,}6 \cdot 1o^{-3}$ Mol/l.

Bei den Inkubationsversuchen zeigte sich, daß Gastrin II im Verlauf einer 5-std. Inkubationszeit mit partikelfreien Überständen aus Rattennierenhomogenat zu niedermolekularen Bruchstücken abgebaut wird. Während nach der 2 Std.-Inkubation neben diesen Bruchstücken noch ein gegenüber der O-Std.-Inkubation und der 5 Std.-Inkubation mit hitzeinaktiviertem Überstand deutlich verminderter Gastrin-Peak im Chromatogramm zu sehen war, war dieser nach der 5 Std.-Inkubation mit aktivem Überstand völlig verschwunden. Die hochspannungseleltrophoretische Untersuchung bestätigte diese Ergebnisse.

In den von JAFFE und NEWTON (1969) durchgeführten Untersuchungen mit ^{125}J markiertem Gastrin wurde 15 Minu-

ten nach der Injektion über der Niere eine wesentlich stärkere Radioaktivität gemessen als über der Leber. Die physiologische Ausscheidung durch die Niere war jedoch gering. Nach Applikation von Gastrin konnten innerhalb von 2 Stunden nur 2% der injizierten Menge radioimmunologisch als intaktes Gastrin im Urin nachgewiesen werden. Im Serum waren 15 Minuten nach Gabe von ^{125}J-Gastrin nur 42,5% der meßbaren Gesamtradioaktivität als intaktes Gastrin nachzuweisen (NEWTON und JAFFE, 1971). Der Rest muß aus inaktiviertem und abgebautem Gastrin bestehen.

Versuche mit Humangastrin, Gastrin II aus Schweinemägen und Pentagastrin zeigten einen deutlichen Wirkungsverlust dieser Substanzen nach Leberpassage beim Menschen (THOMPSON, REEDER, DAVIDSON, CHARTERS, BRÜCKNER, LEMMI u. MILLER, 1969; BEGER, WITTE, MEVES u. KRAAS, 197o; LICK, WELSCH, HART, BRÜCKNER, BALSER u. GÜRTNER, 1967). Dieser Wirkungsverlust wurde von anderen Untersuchern in Frage gestellt (Mc GUIGAN, JAFFE u. NEWTON, 197o). In Untersuchungen mit partikelfreien Rattenzellhomogenaten konnte SEELIG (1971) als Ursache dieses Wirkungsverlustes jedoch eindeutig enzymatische Prozesse nachweisen.

Die Niere kann nicht der alleinige Lieferant für die in ihr von JAFFE und NEWTON (1969) gefundenen Gastrinabbauprodukte sein. Die Affinität des partikelfreien Überstandes aus Rattennierenhomogenat gegenüber Gastrin II war bei den hier durchgeführten Untersuchungen nur halb

so groß, wie die Affinität des partikelfreien Überstandes aus Rattenleberhomogenat (SEELIG, 1971). Die Abbaurate der spezifischen Nierenamidase war allgemein niedriger als die der Leberamidase. Die maximale Hydrolyserate in den Versuchen zur Ermittlung des pH-Optimums lag 3o% unter der, die mit partikelfreien Überständen aus Rattenleberhomogenat im entsprechenden Versuch erzielt wurde. Die gegenüber dem partikelfreien Überstand aus Rattenleberhomogenat längere Lagerungsdauer des partikelfreien Überstandes aus Nierenhomogenat von einigen Tagen könnte Ursache für diese Aktivitätsminderung gewesen sein. Dafür sprechen die Ergebnisse der Untersuchungen der weiteren Hydrolyse von Gastrin II durch Nierenzellüberstände. Die niedermolekularen Bruckstücke, die nach der weiteren Hydrolyse des Gastrins eluiert wurden, besitzen nach dem Elutionsdiagramm ein annähernd gleiches Molekulargewicht wie die Peptidbruchstücke aus den Inkubationen mit Leberzellüberstand. Auch auf dem Pherogramm der Hochspannungselektrophorese zeigt sich kein signifikanter Unterschied (SEELIG, 1971).

Die vorliegenden Versuchsergebnisse zeigen, daß die Niere in ihrer Fähigkeit, Gastrin II zu desamidieren der Leber weder qualitativ noch quantitativ überlegen ist. Dem widersprechen die Beobachtungen, daß die Niere nach Injektion ^{125}J markierten Gastrins bedeutend größere Mengen radioaktiven Materials einlagerte als die Leber (JAFFE und NEWTON, 1969). Worauf beruht nun die im Vergleich

zu den anderen Organen so wesentlich höhere Inkorporationsrate der Niere?
Die hier gefundenen Ergebnisse machen zusammen mit den Ergebnissen der Untersuchungen der Inaktivierung und des Abbaues von Gastrin in anderen Organen wahrscheinlich, daß die Niere Sammelbecken für in ihr selbst und in anderen Organen inaktivierte und zu Bruckstücken abgebaute Gastrinmoleküle ist. In den Untersuchungen von JAFFE und NEWTON (1969) wurde nicht das Gastrin selbst, sondern nur die Radioaktivität über den Geweben gemessen. Der gewählte Zeitabstand von 15 Minuten (NEWTON und JAFFE, 1971) war zu groß, um genaue Aussagen über die Herkuft des radioaktiven Materials in der Niere zu machen.

Die hier gefundenen Ergebnisse bestätigen, daß die Niere selbst in der Lage ist, mit Hilfe einer spezifischen Amidase ihres Enzymsystems das Gastrinheptadekapeptid durch Desamidierung des C-terminalen Phenylalaninamids zu inaktivieren und durch weitere Hydrolyse zu niedermolekularen Bruchstücken abzubauen.
Es bleibt die Frage offen, ob eine solche Desamidierung den einzigen Abbauweg darstellt. Die Ergebnisse sprechen zusammen mit den Ergebnissen anderer Untersuchungen gegen die aufgrund radioimmunologischer Messungen gehegte Annahme, die Niere sei Hauptabbaustätte des Gastrins. Ob ein alleiniger Verlust der Inaktivierungs- und Abbaufähigkeit von Gastrin in diesem Organ klinisch wichtige pathophysiologische Bedeutung für den Gesamtstoffwechsel des Gastrins erlangt, ist nicht bekannt. Die von anderen Untersuchern

gemessenen Wirkungsverluste nach Leberpassage und die Untersuchungen des enzymatischen Abbaues von Gastrin in der Leber zeigen eine der Niere nicht nachstehende Abbaufähigkeit dieses Organs und machen wahrscheinlich, daß die Leber neben möglichen weiteren Organen den Ausfall der Abbaukapazität der Nieren ausgleichen kann.

E. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die pH-, Zeit- und Substratabhängigkeit der Inaktivierung und der weitere Abbau des Gastrins in der Niere untersucht.
Bei der Extraktion und Reindarstellung von Gastrin wurde nach der Methode von GREGORY und TRACY und ihrer Weiterentwicklung von SEELIG vorgegangen. Die partikelfreien Überstände wurden aus dem Nierenhomogenat der Ratte gewonnen. Indikator für Reaktionsform und Aktivität des im Nierenzellüberstand gesuchten Enzyms war die aus dem Substrat Gastrin freigesetzte Menge Ammoniak. Sie wurde mit Hilfe einer spezifischen enzymatischen Bestimmungsreaktion gemessen. Der Verlauf der Gastrin-Hydrolyse wurde chromatographisch und hochspannungselektrophoretisch untersucht.
Das pH-Optimum des Enzyms lag bei pH 6,4. Bei Inkubationszeiten von 0 - 3o Minuten fand sich im pH-Optimum aufgrund der unter den Versuchsbedingungen im wesentlichen

stattfindenden Hydrolyse der C-terminalen Amidgruppe des Gastrinheptadekapeptids eine fast lineare Funktion von Reaktionszeit und gebildeter Menge Ammoniak. Die Michaeliskonstante des Enzyms betrug: K_m=1,6° $1o^{-3}$Mol/l. Während der weiteren Hydrolyse wurde Gastrin zu niedermolekularen Bruchstücken abgebaut. Es bestätigte sich die Vermutung, daß auch die Niere eine der in der Leber gefundenen, ähnliche spezifische Amidase besitzt, die Gastrin durch Amidhydrolyse am C-endständigen Phenylalaninamid inaktiviert. Ferner zeigte sich, daß auch in der Fähigkeit zurweiteren Hydrolyse des Moleküls weder qualitative noch quantitative Unterschiede zwischen beiden Organen bestehen.

F. Literaturverzeichnis

1. BARRET, A.M.:
Spezific stimulation of gastric acid secretion by a pentapeptide derivative of gastrin
J. Pharm. Pharmacol. 18, 633 (1966)

2. BEGER,H.G., WITTE,C., MEVES,M. und KRAAS,E.:
The effect of the liver on the gastric secretion stimulated with pentagastrin and gastrin II
2nd Symposium European Gastric Club, Erlangen, 1970

3. BONFILS,S., VATIER,J. und ACCARY,J.P.:
Bioassay for gastrin (P.S.U.) and its theoretical and clinical significance
In: CREUTZFELDT,W., Hersg.: Origin, Chemistry, Physiology and Pathophysiology of the Gastrointestinal Hormones
F.K. Schattauer Verlag, Stuttgart-New-York (1970), S. 141

4. DALE,H.H. und LAIDLAW,P.P.:
The physiological action of ß-imidazolylethylamine
J. Physiol. 41, 318 (1910/11)

5. EDKINS,J.S.:
On the chemical mechanism of gastric secretion
Proc. Roy. Soc. Med. B. 76, 376 (1905)

6. FRIESEN,S.R., BOLINGER,R.E., PEARSE,A.G.E. und Mc GUIGAN,J.E.:
Serum gastrin levels in malignant Zollinger-Ellison syndrome after total gastrectomy and hypophysectomy
Ann. Surg. 172, 504 (1970)

7. FRITSCH,W.P., MÜLLER,J., RICK,W. und HAUSAMEN, T.U.:
Serum-Gastrinspiegel und Magensekretion bei Patienten mit Ulcus pepticum
Dtsch.Med. Wschr. 97, 1945 (1973)

8. GLASS,J.D., SCHWARTZ,I.L. und WALTER,R.:
Enzymatic inactivation of peptide hormones possessing a c-terminal amide group
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 63, 1426 (1969)

9. GREGORY,H., HARDY,P.M., JONES,D.S., KENNER,G.W. und SHEPPARD,R.C.:
The antral hormone gastrin.
Structure of gastrin.Nature 2o4, 931 (1964)

10. GREGORY,R.A. u. TRACY, H.J.:
The preparation and properties of gastrin
J. Physiol. 156, 523 (1961)

11. GREGORY, R.A. u. TRACY,H.J.:
The constitution and properties of two gastrins extracted from hog antral mucosa
Gut. 5, 1o3 (1964)

12. HALTER, F., KOHLER,B. und SMITH,G.M.:
A sensitive gastrin bioassay
Helv. med. Acta, Suppl. 5o, 113 (1971)

13. HANSKY,J., SOVENY,C. und KORMAN,M.G.:
Effect of secretion on serum gastrin as measured by immunoassay
Gastroenterology 61, 63 (1971)

14. HANSKY,J., KORMAN, M.G., SOVENY,C. und ST.JOHN, D.J.B.:
Radioimmunoassay of gastrin: studies in pernicious anemia
Gut. 12, 97 (1971)

15. ISENBERG,J., CSENDES,A. und WALSH,J.H.:
Resting and pentagastrin-stimulated gastroesophageal sphincter pressure in patients with Zollinger-Ellison-Syndrom
Gastroenterology 61, 655 (1971)

16. JAFFE,B.M. und NEWTON,W.T.:
Distribution and localization of radioiodinated gastrin
Surg. Forum 2o, 312 (1969)

17. KOMAROV, S.A.:
Gastrin
Amer. J. Physiol. 123, 121 (1938)

18. KOMAROV, S.A.:
Studies on gastrin. I. Methods of isolation of a specific gastric secretagogue from the pyloric mucous membrane and its chemical properties
Rev. Canad. Biol. 1, 191 (1942)

19. KOMAROV, S.A.:
Studies on gastrin. II. Physiological properties of the specific gastric secretagogue from the pyloric mucous membrane
Rev. Canad. Biol. 1, 377 (1942)

20. KORMAN, M.G., SOVENY,C. und HANSKY,J.:
Gastrin studies in gastric ulcer
Gut. 12, 899 (1971)

21. LAI, K.S.:
Studies on gastrin
Gut. 5, 327 (1964)

22. LASTER, L. und WALSH, J.H.:
Enzymatic degradation of c-terminal tetrapeptide amide of gastrin by mammalian tissue extracts
Fed. Proc. 27, 1328 (1968)

23. LICK,R.F., WELSCH,K.H., HART,W., BRÜCKNER,W., BALSER,D. und GÜRTNER,TH.
Zur sekretorischen Funktion des Magens nach Injektion von Histamin, Gastrin und synthetischem Tetrapeptid in den großen Kreislauf und in die Pfortader
Gastroenterology 5, 7 (1967)

24. MAKHLOUF,G.M., McMANUS,J.P.A. und CARD, W.J.:
Dose-response curves for the effect of gastrin II on acid secretion in man
Gut. 5, (1964)

25. McGUIGAN, J.E. und GREIDER,M.H.:
Correlative, immunochemical and light microscopic studies of the gastrin cell of the antral mucosa
Gastroenterology 6o, 223 (1971)

26. McGUIGAN, J.E.:
Immunochemical studies with synthetic human gastrin
Gastroenterology 54, 1oo5 (1968 a)

27. McGUIGAN, J.E., JAFFE,B.M. und NEWTON,W.T.:
Immunochemical measurements of endogenous gastrin release
Gastroenterology 59, 499 (197o)

28. MOORE, F.T., MURAT,J.E., ENDAHL,G.L., BAKER,I.L. und ZOLLINGER,R.M.:
Diagnosis of ulcerogenic tumor of the pancreas by bioassay
Amer. J. Surg. 113, 735 (1967)

29. MORLEY, J.S.:
Structure-activity relationships
Fed.Proc. 27, 1314 (1968)

30. MORLEY, J.S., TRACY, H.J. und GREGORY,R.A.:
Structure - function relationships in the active c-terminal tetrapeptide sequence of gastrin
Nature 2o7, 1356 (1965)

31. NEWTON,W.T. und JAFFE,B.M.:
The fate of intravenously administered radiolabeled gastrin
Surgery 69, 34 (1971)

32. POPIELSKI, L.:
Die Wirkung der Organextrakte und die Theorie der Hormone
Münch. Med. Wschr. 59, 534 (1912)

33. POPIELSKI,L.:
ß-imidazolyläthylamin und die Organextrakte. I. ß-imidazolyläthylamin als mächtiger Erreger der Magendrüsen
Pflüg. Arch. Physiolog. 178, 214 (192o a)

34. POPIELSKI,L.:
ß-imidazolyläthylamin und die Organextrakte
II. Einfluß der Säuren auf die Magensaftsekretion erregende Wirkung der Organextrakte
Pflüg. Arch. Physiol. 178, 237 (192o b)

35. REEDER,D.D., JACKSON,B.M., BAN, J., CLENDINNEN,B.G., DAVIDSON,W.D. und THOMPSON,J.C.:
Influence of hypercalcemia on gastric secretion and serum gastrin concentrations in man
Ann. Surg. 172, 54o (197o a)

36. REEDER,D.D., JACKSON,B.M., BAN,J.L., DAVIDSON,W.D. und THOMPSON J.C.:
Effect of food on serum gastrin concentrations in duodenal ulcer and control patients
Surgical Forum 21, 29o (197o b)

37. RYDON,H.N. und SMITH,P.W.G.:
A new method for the detection of peptides and simular compounds on paper chromatograms
Nature 169, 922 (1952)

38. SEELIG,H.P.:
Habilitationsschrift: Gastrin-Inaktivierung und Abbau
Medizinische Fachbereiche der Freien Universität Berlin, 1971

39. SCHMIDT,E.H. und SCHWARZ,M.:
Über die enzymatische Ammoniakbestimmung im Blut
Klin. Wschr. 44, 591 (1966)

4o. STERN,D.H. und WALSH,J.H.:
Gastrin release in postoperative ulcer patients: evidence for release of duodenal gastrin
Gastroenterology 64, 363 (1973)

41. STREMPLE, J.F., ABRAMOFF,P., VAN OSS,C.J., WILSON,S.D. und ELLISON,E.H.:
Antibodies to synthetic human gastrin I,
Lancet, 1967/II, 118o

42. THOMPSON,J.C., REEDER,D.D., DAVIDSON,W.D., CHARTERS,A.C., BRÜCKNER,W.L., LEMMI,C.A.E. und MILLER,J.H.:
Effect of hepatic transit of gastrin, pentagastrin and histamine measured by gastric secretion and by assay of hepatic vein blood
Ann. Surg. 17o, 493 (1969)

43. TRACY,H.J. und GREGORY,R.A.:
Physiological properties of a series of synthetic peptides structurally related to gastrin I
Nature 2o4, 935 (1964)

44. TRUDEAU,W.L.und McGUIGAN,J.E.:
Serum gastrin levels in patients with peptic ulcer disease
Gastroenterology 59, 6 (197o)

45. TRUEBLOOD,H.W., KOTHATSU,S. und OBERHELMAN, H.A.:
Gastric secretory response to synthetic human gastrin
Study of the effect of nephrectomy
Arch. Surg. 98, 223 (1969)

46. UVNÄS,B., ANDERSON,S., ELWIN,C.E. und MALM,A.:
The influence of exclusion of the antrum-duodenum passage on the HCl secretion in Pavlov pouch dogs
Gastroenterology 3o, 79o (1956)

47. WILKEN, B.J., HARDY,J.D., TURNER,M.D., LOWE,C.F., HUNT,D.G. und BILLUPS,W.A.:
Bioassay in the diagnosis of the Zollinger-Ellison-Syndrom
Ann. Surg. 17o, 922 (1969)

48. WILSON,S.D., MATHISON,J.A., SCHULTE,W.J. und ELLISON,E.H.:
The role of bioassay in the diagnosis of ulcerogenic tumors
Arch. Surg. 97, 437 (1968)

49. YALOW,R.S. und BERSON,S.A.:
Further studies on the nature of immunoreactive gastrin in human plasma
Gastroenterology 6o, 2o3 (1971)

Die vorliegende Arbeit wurde in der Wissenschaftlichen Einrichtung (WE 6) Pathologie im Klinikum Westend der Freien Universität Berlin (damaliger Direktor: Prof. Dr. med. V. Becker) unter der Aufsicht von Herrn Priv.-Doz. Dr. med. H.-P. Seelig angefertigt.

Lebenslauf

Am 22. August 1946 wurde ich als zweiter der acht Söhne des Kaufmanns Hermann Schwenen und seiner Ehefrau Änne, geb. Fehrhut in Lingen/Ems geboren.

Nach dem Umzug meiner Familie nach Haselünne, besuchte ich dort die Volksschule von 1953 bis 1957. Anschließend wurde ich Internatsschüler des Progymnasiums in Wadersloh/Westfalen. 1961 wechselte ich auf den altsprachlich-humanistischen Zweig des Gymnasiums in Meppen. Am 7. Juni 1967 legte ich an diesem Gymnasium die Reifeprüfung ab.

Das Medizinstudium begann ich im Wintersemester 1967/68 an der Freien Universität Berlin. Dort bestand ich am 19. September 1968 die naturwissenschaftliche und am 19. März 197o die ärztliche Vorprüfung. Am 3o. August 1973 beendete ich das Studium mit dem Medizinischen Staatsexamen.